AUS DEM PHARMAKOLOGISCHEN INSTITUT DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

DIREKTOR: PROF. DR. MED. HANS HERKEN

EINFLUSS VON 6-AMINONICOTINSÄUREAMID AUF DIE DEHYDROGENASEN DES OXIDATIVEN PENTOSE-PHOSPHAT-WEGES IN DER RATTENNIERE

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE
DER EHEM. MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON

ERNST REINHARD PROFT
AUS ZEITZ

1970

AUS DEM PHARMAKOLOGISCHEN INSTITUT DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

DIREKTOR: PROF. DR. MED. HANS HERKEN

EINFLUSS VON 6-AMINONICOTINSÄUREAMID AUF DIE DEHYDROGENASEN DES OXIDATIVEN PENTOSE-PHOSPHAT-WEGES IN DER RATTENNIERE

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE
DER EHEM. MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON

ERNST REINHARD PROFT
AUS ZEITZ

EHEM. DEKAN: PROF. DR. MED. HERBERT L A X
REFERENT: PROF. DR. MED. HANS H E R K E N
KORREFERENT: PROF. DR. MED. HELMUT C O P E R

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

GEDRUCKT MIT GENEHMIGUNG DER EHEM. MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

PROMOVIERT AM: 28.10.70

D A S K R I T E R I U M D E R W A H R H E I T

I S T D I E P R A X I S MAO-TSE-TUNG

MEINER MUTTER GEWIDMET

DANK FÜR RAT UND HILFE SCHULDE ICH MEINEN KOLLEGEN
KLAUS, INGRID, HANS UND CHRISTINE

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG 5

METHODEN 8

MESSUNG DER KONZENTRATIONEN VON 6-GP, G-6-P UND F-6-P 8

MESSUNG DER ENZYMAKTIVITÄTEN 9

PRÄPARATION DER NIERENENZYME 10

MESSUNG DER K_M-WERTE 11

MESSUNG DER K_1-WERTE 13

ERGENNISSE 14

BESTIMMUNG DER SUBSTRATKONZENTRATIONEN NACH 6-AN 14

ENZYMAKTIVITÄTEN NACH 6-AN 15

BESTIMMUNG DER K_M- UND K_1-WERTE VON G-6-PDH UND 6-PGDH IN HEFE UND RATTENNIERE 15

DISKUSSION 16

LITERATUR 20

ABBILDUNGEN 21

LEBENSLAUF 33

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG 3

METHODEN 5

MESSUNG DER KONZENTRATIONEN 5
VON 6-CP_1 6-6-P UND F-6-P

MESSUNG DER ENZYMAKTIVITÄTEN 5

PRÄPARATION DER MITOCHONDRIEN 10

MESSUNG DER K_M^{ADP}-WERTE 11

MESSUNG DER K_i^{ATP}-WERTE 13

ERGEBNISSE 14

BESTIMMUNG DER SUBSTRATKONZENTRATIONEN 14
NACH 6-AN

ENZYMAKTIVITÄTEN NACH 6-AN 13

BESTIMMUNG DER K_M^{ADP}- UND K_i^{ATP}-WERTE VON 15
6-6-PCH, UND 6-PCOH IN MCPS UND RATTENNIEREMITOCHONDRIEN

DISKUSSION 16

LITERATUR 20

ABBILDUNGEN 21

LEBENSLAUF 32

E I N L E I T U N G

Im Jahre 1955 wurde erstmals durch Johnson und McColl auf die biologische Aktivität von 6-Aminonicotinsäureamid (6-AN) als Nicotinsäureamid - Antagonist hingewiesen (1). Denselben Forschern gelang 1956 die Isolierung des 6-AN-Analogen des Nicotinamid-adenin-dinucleotids (NAD), des 6-Aminonicotinsäureamid-adenin-dinucleotids (6-ANAD), aus einem Reaktionsgemisch von Schweinehirn-NAD-ase, NAD und 6-AN und somit der Nachweis, daß 6-AN in NAD eingebaut wird. Diese Substanz, 6-ANAD, konnten die gleichen Autoren auch in Lebern und Nieren von mit 6-AN behandelten Mäusen nachweisen (2).
Dietrich, Friedland und Kaplan bestätigten 1958 diese Befunde und wiesen weiter darauf hin, daß analog dem 6-ANAD ein 6-AN-Derivat des Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphats (NADP), das 6-Aminonicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat (6-ANADP), in Lebern und Nieren von Mäusen gebildet wird (3).
In dieser Arbeit werden auch die in vitro-Synthesen von 6-ANAD und 6-ANADP beschrieben. Kaplan und Ciotti bezeichneten 1954 den Aufbau dieser unphysiologischen Dinucleotide als Ausdruck der Unspezifität der NAD(P)-Glycohydrolase (EC 3.2.2.6) (4) (Abb. 1).
Die abnorm strukturierten Dinucleotide funktionieren nicht als Wasserstoffüberträger (Dietrich, Friedland und Kaplan (3); Brunnemann, Coper und Neubert (5)).
Spektrofluorometrische Untersuchungen von Herken und Neuhoff 1964 (6) an Rattennieren ergaben, daß 6 Std. nach i.p.-Applikation von 6-AN 38,5% des NAD in 6-ANAD und bis zu 70% des

NADP in 6-ANADP umgebaut waren. An isolierten Mikrosomen fanden Brunnemann, Coper und Herken 1963 (7) eine raschere Synthese unphysiologischer Dinucleotide in Gegenwart von NADP als in Gegenwart von NAD.
Das erklärt sich daraus, daß für diese Reaktion die oxydierten Formen der Dinucleotide nötig sind, NAD aber in stärkerem Maße als NADP in der reduzierten Form vorliegt. Coper und Neubert fanden, nachdem sie 1963 (8) eine Hemmung der Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase (G-6-PDH) (EC 1.1.1.49) durch 3-Acetyl-pyridin-adenin-dinucleotid-phosphat (3-APADP) festgestellt hatten, eine kompetitive Hemmung eben dieses Enzyms durch 6-ANADP (9). Es war aber noch nicht klar, welche NADP-abhängigen Enzymsysteme in vivo durch Biosynthese von 6-ANADP beeinflußt werden.
Unter den NADP-abhängigen Enzymen sind es zwei, nämlich 6-P-GDH und G-6-PDH, die Reaktionen im PPW (Pentose-Phosphat-Weg) (Abb. 2) katalysieren. Die durch 6-ANADP zu erwartende Beeinflussung dieser Reaktionen untersuchten Herken und Lange (10) sowie Herken, Lange und Kolbe im Jahr 1969 (11) an den Hirnen von Ratten. Sie stellten fest, daß der PPW in vivo durch 6-ANADP stark gehemmt wird und der limitierende Faktor wahrscheinlich bei der 6-Phospho-gluconat-dehydrogenase (6-PGDH) (EC 1.1.1.44) als dem gegen 6-ANADP empfindlichsten Enzym zu suchen ist. Den von ihnen ebenfalls beobachteten Anstau von G-6-P erklärten sie mit der Hemmung der Phospho-glucose-isomerase (PGI) (EC 5.3.1.9) durch 6-Phospho-gluconat (6-PG), wie sie von Parr 1956 und 1957 (12, 13), Noltmann und Bruns 1959 (14), Salas, Vinuela und Sols 1965 (15) beschrieben wurde. Damit war zu vermuten, daß unter dem Einfluß

von 6-ANADP sowohl der oxidative, "obere", als auch der nichtoxidative, "untere" Weg und somit der Aufbau der für die RNS- und DNS-Synthese notwendigen Ribose gestört werden.

Im Jahr 1964 berichteten Herken, Senft und Zemisch (16) über eine Abnahme der tubulären Rückgewinnung von Natrium in Rattennieren nach der i.p.-Gabe von 6-AN in Abhängigkeit von der Dosis.

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob Befunde, wie sie Herken, Lange und Kolbe (10, 11) am Rattenhirn beschrieben haben, auch für die Rattenniere gelten. Durch die Bestimmung der K_M- und K_i-Werte für NADP und 6-ANADP soll das Verhalten von 6-PGDH und G-6-PDH untersucht werden. Die Langzeitversuche sollen klären, ob in der Niere Aktivitätsänderungen regulatorischen Charakters (Induktion) der beiden untersuchten Enzyme, G-6-PDH und 6-PGDH, nach Gabe von 6-AN auftreten. Hierbei war zunächst zu prüfen, ob in der Niere ebenfalls eine Akkumulation von 6-PG stattfindet.

METHODEN

Messung der Konzentrationen von 6-PG, G-6-P und F-6-P

150 - 200 g schweren männlichen Ratten vom Typ Sprague-Dawley wurden 35 mg/kg respektive 6 mg/kg Körpergewicht einer 6-AN-Lösung i.p. injiziert. Diesen und den Kontrolltieren wurden Futter und Wasser entzogen. Nach verschiedenen Zeiträumen (Abb. 3, 4) wurden die Tiere decapitiert, die Nieren, von den Bindegewebskapseln befreit, entnommen, gewogen, in 3 ml $HClO_4$ homogenisiert, bei 5000 Upm 10 min. zentrifugiert, der Niederschlag mit 2 ml $HClO_4$ gewaschen und nochmals bei 5000 Upm 10 min. zentrifugiert. Die Überstände beider Ansätze wurden zusammengegeben und mit K_2CO_3 bis pH 5 - 7 titriert und über Nacht stehengelassen. Die Flüssigkeit wurde nach Ausfällung des Perchlorats dekantiert, der Niederschlag nochmals mit 1 - 2 ml aqua dest. gewaschen und die Flüssigkeit nach ca. 2 min. (Absetzen der Kristalle) dekantiert und zur Hauptmenge gegeben, das Ganze in Meßkolben mit aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt und nochmals 10 min. bei 5000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Bestimmung in verschließbaren Gläschen aufbewahrt.

Die Bestimmung erfolgte mit dem Spektralphotometer DMR 21 der Fa. Zeiss unter Verwendung von Quarzküvetten derselben Firma mit einer Schichtdicke von 1, 2 und 5 cm. Sie wurde durchgeführt in 0,4 m Triäthanolamin-HCl-Puffer vom pH 7,6, $MgCl_2$ und NADP-Lösung (20 mg/ml)[1].

1) bezogen von der Fa. Boehringer, Mannheim

Gestartet wurde die Reaktion mit 10 µl einer Lösung von 6-PGDH[1], respektive mit 5 µl einer solchen von G-6-PDH[1]. Der F-6-P-Gehalt wurde im Ansatz für G-6-P nach Ablaufen der durch G-6-PDH ausgelösten Reaktion durch Zusatz von 5 µl einer Lösung PGI[1] bestimmt. Zum Pipettieren der Mengen von 1 ml abwärts wurden Marburg-Pipetten der Fa. Eppendorf werwendet.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach der Formel

$$\frac{\Delta E \cdot V_M \cdot V_G}{\varepsilon \cdot d \cdot V_P \cdot gFG} = \mu Mol/gFG$$

wobei V_M der Küvetteninhalt, V_G das Gesamtvolumen der Probelösung, V_P das Volumen der Probelösung in der Küvette und FG das Frischgewicht der Nieren sind. ΔE ist die gemessene Extinktionsdifferenz, ε der Extinktionskoeffizient, der hier 6,28 Mol/cm^2 beträgt, und d die Schichtdicke der Küvette

Messung der Enzymaktivitäten

Vier 150 -200 g schweren männlichen Ratten vom Typ Sprague-Dawley wurden 6 bzw. 35 mg/kg KG 6-AN-Lösung i.p. injiziert. Diesen sowie den Kontrollen wurden Futter und Wasser entzogen. Die Tiere wurden nach verschiedenen Zeiträumen (Abb. 5, 6) im Kühlraum bei 4° C decapitiert, die Nieren, von der Bindegewebskapsel befreit, entnommen, gewogen, mit 0,25 m Saccharose auf 12 g aufgefüllt, homogenisiert und bei 150000 g zentrifugiert. Die fetthaltige Oberschicht wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, das Sediment verworfen und der Überstand in verschlossenen Gefäßen kühl aufbewahrt.

---

1) bezogen von der Fa. Boehringer, Mannheim

Die Aktivitätsmessung erfolgte mit dem Spektralphotometer DMR 21[1] in Quarzküvetten der Schichtdicke von 1 cm. Es wurde ein 0,4 m Triäthanolamin-HCl-Puffer vom pH 7,6 verwendet, dem Mg^{++} - Ionen in einer 10^{-3} m Konzentration und AEDTA in 5.10^{-3} molarer Konzentration beigesetzt waren. In die Meßküvette pipettiert wurden 1 ml Hyaloplasma, 1 ml des Puffers sowie 50 µl einer NADP-Lösung (20 mg/ml), hergestellt aus kristallinem NADP[2]. Gestartet wurde mit 50 µl einer Substratlösung (20 mg/ml), die aus kristallinem G-6-P[2] bzw. 6-PG[2] hergestellt wurde.
Die NADP-Konzentration war so hoch, daß der Reaktionsablauf nicht durch das im Gewebe enthaltene 6-ANADP gestört werden konnte.

Präparation der Nierenenzyme

Zwei 200 g schwere männliche Ratten vom Typ Sprague-Dawley wurden bei 4° C decapitiert, die Nieren aus der capsula fibrosa entnommen, in 10 ml 0,25 m Saccharose homogenisiert, bei 150000 g und 4° C zentrifugiert, die fetthaltige Oberschicht mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Sediment verworfen.

Um die niedermolekularen Bestandteile (Cofaktoren und Substrate) bis zum Molekulargewicht von etwa 5000 von der Proteinfraktion abzutrennen, wurde die Hyaloplasma-Fraktion über eine auf 14° C wassergekühlte Dextran-Gel-Säule[3] mit einem Durchmesser von 2,5 cm und einer Länge von 45 cm gegeben und mit aqua destillata 15 ml/h eluiert. Mittels eines angeschlossenen

---

1) Fa. Zeiss, 2) Fa. Boehringer, Mannheim,
3) Sephadex G 25 medium der Fa. Pharmacia, Uppsala

Ultraviolettphotometers, Uvicord[3], wurde ein Elutionsdiagramm (Abb. 7) bei der Wellenlänge von 280 nm geschrieben. In diesem Wellenlängenbereich liegt das Absorptionsmaximum der aromatische Aminosäuren enthaltenden Peptide. Durch einen mit der genannten Apparatur kombinierten Fraktionssammler, LKB[3], wurden Fraktionen von jeweils 50 Tropfen aufgefangen. Durch einfaches Auszählen der Röhrchen war eine Zuordnung von Fraktionen zur Elutionskurve möglich. Die Fraktionen mit der stärksten Absorption wurden auf ihren Gehalt an G-6-PDH und 6-P-GDH spektralphotometrisch untersucht. Es wurden dann für jedes Enzym die 3 Fraktionen der stärksten Enzymaktivität vereinigt, da auf diese Weise die für die gewünschten Untersuchungen benötigte Menge von ca. 15 ml erhalten wurde. Im abgebildeten Beispiel waren das die Fraktionen 24-26 für die G-6-PDH- und die Fraktionen 27-29 für die 6-P-GDH-Lösung. Auf diese Weise wurde zwar keine Trennung, aber doch eine gewisse Reinigung des jeweils gewünschten Enzyms erzielt. Diese Fraktionen waren frei von den Substraten der genannten Enzyme.

Messung der Michaeliskonstanten (K_M-Werte)

0,2 ml einer Enzymlösung[1] geeigneter Aktivität (siehe unten) wurden mit 2 ml einer NADP[1]-Puffer-Lösung[2] verschiedener NADP-Konzentrationen (Tab. 1) in einer Quarzküvette (Fa. Zeiss) von 1 cm Schichtdicke gemischt. Dieser Ansatz wurde in das Spektralphotometer PMQ II (Fa. Zeiss) gegeben und die Reaktion mit 50 µl einer G-6-P[1]- bzw. 6-PG[1]-Lösung (20 mg/ml) gestartet. Der Küvetteninhalt wurde 4 sec lang mit einem Kunststoffspatel kräftig gemischt und die Extinktion nach 10, 20, 30, 60 und 120sec

1) Fa. Boehringer, Mannheim, 2) Pufferzusammensetzung wie bei Aktivitätsmessungen, 3) Fa. Colora

abgelesen. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit ermittelt, wobei vom 10-sec-Wert an gerechnet wurde, da die Werte der ersten 10 sec stark schwankten, bedingt durch ungleichmäßige Durchmischung und das nur langsam erfolgende Einpendeln des Anzeigegerätes nach Schließen des Küvettenraumes.

Zu beachten war, daß nicht nach beliebig langen Zeiträumen abgelesen werden konnte, da nach einer bestimmten Zeit zuviel NADP verbraucht sein würde. Als Grenze wurde die Extinktionsdifferenz gewählt, die dem Verbrauch eines Fünftels der eingesetzten NADP-Menge entsprach. Die Reaktion verbraucht NADP. Die durch diesen Konzentrationsabfall bedingte Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeitwährend der Messung wird durch Anwendung der in den Grenzen von S_o- S und t_o- t integrierten Lineweaver-Burk-Gl. berücksichtigt.

$$\frac{1}{v_t} = \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{\ln \frac{1}{1-\alpha}}{\alpha} \cdot \frac{1}{S_o} + \frac{1}{v_{max}} ; \quad v_t = \frac{S_o - S_t}{t} = \frac{S_o - S_t}{S_o}$$

Die reziproken Werte der Extinktionsdifferenzen, die den Reaktionsgeschwindigkeiten proportional sind, wurden auf der Ordinate, die der korrigierten NADP-Konzentrationen auf der Abszisse eingetragen, die so ermittelten Punkte durch eine Gerade verbunden und der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Abszisse bestimmt. Die Kehrwerte dieser Schnittpunkte sind die gesuchten Michaeliskonstanten. (Abb. 8-10)

Messung der K_1-Werte (Hemmkonstanten)

Die Methode folgt der bei der Bestimmung der Michaeliskonstanten soeben beschriebenen, mit der Modifikation, daß bei abgestufter NADP-Konzentration und variierter 6-ANADP-Konzentration gemessen wurde (Tab. 2 a-c).

Die Auswertung erfolgte nach Dixon, indem die reziproken Extinktionsdifferenzen in Abhängigkeit von der NADP-Konzentration aufgetragen wurden (Abb. 12-15), und nach Lineweaver-Burk (Abb. 16-19).

E R G E B N I S S E

Bestimmung der Substratkonzentrationen nach 6-AN

Unter der Gabe von 6 mg 6-AN/kg KG steigt G-6-P nach 48 Std. auf 0,046 µM/g an, um nach etwa 144 Std. auf den Normalwert von 0,030 µM/g FG zurückzukehren. Die F-6-P-Konzentration verändert sich nicht (Abb. 4). Dadurch ändert sich der G-6-P/F-6-P-Quotient von 2,9 bei den Kontrollen auf 5,9, 48 Std. nach 6 mg 6-AN/kg KG.
6-PG erreicht nach 24 Std. einen maximalen Wert von 1,07 µM/g FG und kehrt dann allmählich bis zum Versuchsende nach 168 Std. nahezu auf den Ausgangswert zurück (Abb. 4).

Nach 35 mg 6-AN/kg KG wurde ein Anstieg von G-6-P beobachtet, der nach etwa 4 Std. beginnt, nach etwa 12 Std. ein Maximum von 0,074 µM/g FG erreicht und bis zum Versuchsabbruch nach etwa 22 Std. auf 0,057 µM/g FG zurückgeht. Die 6-PG-Konzentration steigt schon nach etwa 2 Std. leicht an, erreicht nach etwa 9 1/2 Std. einen Gipfel von 3,17 µM/g FG und bleibt in etwa auf dieser Höhe bis zum Versuchsabbruch nach 22 Std. Bei F-6-P zeigen sich keine signifikanten Veränderungen (Abb. 3).

Die statistische Auswertung der Werte 9 1/2 Std. nach 35 mg 6-AN/kg KG ergibt eine signifikante Erhöhung der G-6-P-Konzentration ($p<0,001$). Die F-6-P-Konzentration ist nicht signifikant erniedrigt ($p<0,05$) (Abb. 20). Der Quotient G-6-P/F-6-P erhöht sich von 2,9 auf 5,9. Die 6-PG-Konzentration liegt bei 3,17µM/g FG bei den Versuchstieren, während sie bei den Kontrollen unterhalb der Meßgenauigkeit der von uns benutzten Methode lag (Abb. 21).

Enzymaktivitäten nach der i.p. Gabe von 6 mg 6-AN/kg KG

Die Versuchstiere wurden im Abstand von jeweils 24 Std. decapitiert und die Aktivitäten von G-6-PDH und 6-PGDH bestimmt. Eine Induktion kann aus diesen Ergebnissen nicht abgelesen werden (Abb. 5, 6).

Bestimmung der K_M- und K_1-Werte von G-6-PDH sowie 6-PGDH in Hefe und Rattennieren

Die Bestimmung der K_M- und K_1-Werte für das Substrat NADP und den Hemmstoff 6-ANADP brachte folgende Ergebnisse:

	G-6-PDH		6-PGDH	
	K_M	K_1	K_M	K_1
Hefe	$2{,}8 \cdot 10^{-5}$	$2{,}7 \cdot 10^{-5}$	$2{,}5 \cdot 10^{-5}$	$4{,}7 \cdot 10^{-7}$
	$3{,}0 \cdot 10^{-5}$	$2{,}8 \cdot 10^{-5}$	$2{,}6 \cdot 10^{-5}$	$4{,}7 \cdot 10^{-7}$
Niere	$1{,}0 \cdot 10^{-5}$	$1{,}6 \cdot 10^{-5}$	$3{,}3 \cdot 10^{-5}$	$4{,}4 \cdot 10^{-7}$
	$1{,}0 \cdot 10^{-5}$	$1{,}3 \cdot 10^{-5}$	$3{,}6 \cdot 10^{-5}$	$4{,}9 \cdot 10^{-7}$
	$1{,}2 \cdot 10^{-5}$	$1{,}9 \cdot 10^{-5}$	$4{,}2 \cdot 10^{-5}$	
	$1{,}3 \cdot 10^{-5}$			

D I S K U S S I O N

Der gemeinsame Anstieg von G-6-P und 6-PG und der zeitliche Vorsprung des 6-PG-Anstiegs weisen darauf hin, daß der Hauptangriffspunkt der 6-ANADP-Wirkung im Bereich der G-6-PDH und der 6-PGDH liegt, wobei die durch die 6-PGDH katalysierte Reaktion am stärksten gehemmt werden dürfte. Für den Fall, daß durch 6-ANADP vorrangig oder fast ausschließlich die 6-PGDH-Reaktion gehemmt ist, müßte die Anreicherung von G-6-P im Gewebe durch einen anderen Mechanismus als den beschriebenen hervorgerufen werden. Eine plausible Erklärung dafür bietet die von Noltmann und Bruns (14) beobachtete Hemmung der PGI-Reaktion durch 6-P-Gluconat. Diese Vermutung findet eine Bestätigung im Anstieg des Massenwirkungsquotienten der Isomerase-Reaktion G-6-P/F-6-P von 2,9 auf 5,9. Man könnte sich vorstellen, daß durch die an dieser Stelle stattfindende Drosselung der Glycolyse eine so starke Beeinträchtigung der Energiegewinnung in der Tubuluszelle erfolgt, daß die energieverbrauchenden Vorgänge der renalen Kontrolle des Ionen-Haushalts empfindlich gestört werden, wie es Herken, Senft und Zemisch (16) beschrieben haben.

Sie stellten fest, daß unter dem Einfluß von 6-AN die Na-Rückresorption gestört wird. Wiederholt, Hierholzer, Senft und Herken gelang es 1968, diese Störung im distalen Tubulus zu lokalisieren (18).
In einer 1966 (21) veröffentlichten Arbeit gingen Losert, Senft, Sitt, McEvoy und Kaess den Ursachen der Störung weiter nach.

Sie hemmten die ATP-Synthese mit 2,4-Dinitrophenol und wiesen nach, daß dabei die Na-Rückresorption nur geringfügig gehemmt wurde, obwohl die ATP-Konzentration in der Niere bedeutend stärker gesenkt war, als unter der Einwirkung von 6-AN.
Nach wie vor muß an die Möglichkeit gedacht werden, daß unter dem Einfluß von 6-AN ein Prozeß gehemmt wird, der für die Energieversorgung der Na-Pumpe entscheidend ist.
Möglicherweise ließe sich allerdings der Anstieg der intrazellulären Na-Ionen-Konzentration, zumindest in der Leber, erklären als elektrischer Ausgleich des Anstiegs der negativen Ladung, wie ihn der Konzentrationsanstieg der 6-P-G-Ionen in der Zelle bedingt.
Die Untersuchungen der 6-AN-Einwirkung über längere Zeit ergaben, daß bei der i.p. Gabe von 35 mg 6-AN/kg KG die erhöhten Substratkonzentrationen in der Niere bis zum Intoxikationstod der Tiere nach 22 Std. bestehen bleiben. (Abb. 3) Nach der i.p.-Gabe von 6 mg 6-AN/kg KG, bei der die Tiere überleben, gingen die Substratkonzentrationen erst nach 6-7 Tagen auf die Ausgangswerte zurück (Abb. 4). Das unterstreicht die Ergebnisse von Brunnemann und Coper (17), die eine sehr geringe Hydrolyse-Geschwindigkeit der 6-AN-Dinucleotide auf grund ihrer langsamen Ausscheidung aus der Zelle festgestellt hatten.
Es bleibt zu klären, warum die diuretischen Störungen nach bereits 8 Std. zurückgehen, obwohl (bei der Dosis von 35 mg 6-AN/kg KG) die Konzentrationen von 6-PG und G-6-P über mindestens 22 Std. gleichbleibend erhöht sind.
Es hat sich gezeigt, daß bei einer Dosierung von 6 mg 6-AN/kg KG erst wesentlich später als nach 35 mg 6-AN/kg KG das Maximum

der 6-PG-Konzentration im Nierengewebe erreicht wird. Das ist ein Hinweis darauf, daß tatsächlich die wirksame Substanz ein Folgeprodukt der ursprünglichen Verbindung ist, deren Bildungsgeschwindigkeit von der injizierten Dosis abhängig ist. Zur Klärung der Frage, ob die beobachteten Effekte auf einer Hemmung der 6-PGDH beruhen, wurden die K_M- und K_i- Werte von G-6-PDH und 6-PGDH mit NADP als Substrat und 6-ANADP als Hemmstoff bestimmt. Dabei wurde gefunden, daß die Hemmkonstanten der G-6-PDH für 6-ANADP in Hefe und Niere ungefähr von der gleichen Größenordnung waren, wie die K_M-Werte für NADP. Demgegenüber lagen die entsprechenden K_i-Werte der 6-PGDH fast zwei Zehnerpotenzen über den K_M-Werten (in allen Fällen liegen die K_M- und K_i-Werte für die Hefe- und Nierenenzyme in der gleichen Größenordnung, obwohl es sich bei den Hefeenzymen um gereinigte Präparate, bei den Hyaloplasma-Fraktionen der Niere aber um Enymgemische handelt (Tab. S. 15).

Die Auftragung der Meßergebnisse in Lineweaver-Burk-Diagrammen zeigt, daß es sich bei beiden Enzymen um eine kompetitive Hemmung zwischen den Partnern NADP und 6-ANADP handelt (Abb. 16-19). Beide Reaktionen sind Glieder einer Reaktionskette (Abb. 2), sodaß in vivo die Reaktionspartner in einem steady state (Fließgleichgewicht) vorliegen; das heißt, daß die Konzentrationen der Zwischenprodukte zeitlich konstant sind und sich in dem Moment ändern, wo eine Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit an einer Reaktionsstufe auftritt. Verringert sich die Reaktionsgeschwindigkeit auf einer Reaktionsstufe, hat das eine Konzentrationserhöhung des Ausgangsproduktes dieser Stufe zur Folge.

Die hier untersuchte Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit

durch 6-ANADP betrifft allerdings nicht eine, sondern zwei Reaktionsstufen. Ein Anstau von 6-PG kommt aber dadurch zustande, daß die Hemmkonstante des 6-ANADP für 6-PGDH um etwa das Hundertfache niedriger liegt als für G-6-PDH. Offen bleibt die Frage, ob die Fließgeschwindigkeit durch den "oberen Weg" unter dem 6-PG-Anstau erhalten bleibt oder verringert wird.

Sollte letzteres der Fall sein, könnte mit einer Hemmung der Nucleinsäure-Synthese unter dem Einfluß von 6-AN gerechnet werden, sofern nicht eine Kompensation über den "unteren Weg" stattfindet.

Obgleich nach den oben angeführten Untersuchungen von Parr (12, 13), Noltmann und Bruns (14), sowie Salas u.a. (15) eine Hemmung der Isomerase-Raktion durch das erhöhte 6-PG des "oberen Weges" erfolgt, Konnte eine Verringerung der F-6-P-Konzentration nicht nachgewiesen werden, sodaß für eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit auch auf dem "unteren Weg" keine Anhaltspunkte vorliegen.

Die Höhe des F-6-P-Spiegels sagt jedoch noch nichts über die Fließgeschwindigkeit im "unteren Weg" aus, der nach Brandt mit mindestens 60% an der Ribose-5-P-Synthese des PPW beteiligt ist. Inwieweit kompensatorische Effekte über diesen Weg Bedeutung erlangen, bleibt weiteren Untersuchungen an den Einzelschritten des PPW vorbehalten.

Die Hemmung des "oberen Weges" gibt die Möglichkeit, die beiden Wege der Ribose-5-P-Synthese einzeln zu studieren und ihre prozentualen Anteile zu bestimmen.

L I T E R A T U R

1 Johnson, W.J. und McColl, J.D.: Science, 122 (1955) 834.
2 Johnson, W.J. und McColl, J.D.: Fed.Proc.,15 (1956) 284
3 Dietrich, L.S., Friedland, Ira M. u. Kaplan, Leatrice A.: J.B.C., 233 (1958) 964.
4 Kaplan, N.O. und Ciotti, M.M.: J.A.Ch.S., 76 (1954) 1713.
5 Brunnemann, A., Coper, H. und Neubert, D.: N.S. Archiv 246 (1964) 437.
6 Herken, H. und Neuhoff, V.: N.S. Archiv, 247 (1964) 187.
7 Brunnemann, A., Coper, H. und Herken, H.: N.S. Archiv, 245 (1963) 541.
8 Coper, H. und Neubert, D.: J. Neurochem., 10 (1963) 513.
9 Coper, H. und Neubert, D.: BBA, 89 (1964) 23.
10 Herken, H. und Lange, K.: N.S. Archiv, 263 (1969) 496.
11 Herken, H., Lange, K., Kolbe, H.: B.B.R.Comm., 36 (1969) 94.
12 Parr, C.W.: Nature, 178 (1956) 1401.
13 Parr, C.W.: Biochem. J., 65 (1957) 34.
14 Noltmann, E. und Bruns, F.H.: Biochem. Z., 331 (1959) 436.
15 Salas, M., Vinuela, E. u. Sols, A.: JBC, 240 (1965) 561.
16 Herken, H., Senft, G., und Zemisch, R.: N.S. Archiv, 249 (1964) 54.
17 Brunnemann, A. und Coper, H.: N.S. Archiv, 246 (1963/64) 63.
18 Wiederholt, M., Hierholzer, K., Senft, G. und Herken, H.: N. S. Archiv, 261 (1968) 143.
19 Zatman, L.J., Kaplan, N.O., Colowick, S.P. und Ciotti, M.M.: JBC, 200 (1953) 197.
20 Zatman, L.J., Kaplan, N.O., Colowick, S.P. und Ciotti, M.M.: JBC, 209 (1954) 453.
21 Senft, G., Losert, W., Sitt, R., McEvoy, J. und Kaess, H.: N.S. Archiv, 255 (1966) 388.

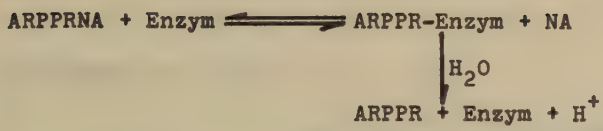

Abb. 1 Schema der Glycohydrolase-Reaktion (nach Zatman)(19,20)

ARPPR (Adenosin-Ribose-Pyrophosphat-Ribose)

Das Wasser konkurriert bei dieser Reaktion mit dem Nicotinsäureamid in Bezug auf den ARPPR-Enzym-Komplex. Mit 6-AN reagiert dieser ARPPR-Enzym-Komplex analog unter Bildung der unphysiologischen Dinucleotide.

Tab. 1:

Konzentrationen der NADP-Puffer für die Messung der Michaeliskonstanten von G-6-PDH und 6-PGDH in Rattenniere u. Hefe

$1{,}5 \cdot 10^{-5}$m, $2 \cdot 10^{-5}$m, $4 \cdot 10^{-5}$m, $1 \cdot 10^{-4}$m, $1 \cdot 10^{-3}$m

Tab. 2 a-c:

Konzentrationen von NADP und 6-ANADP in den zur Messung der K_1-Werte verwendeten Puffern.

a. G-6-PDH (Rattenniere und Hefe):

NADP (10^{-5}m): 4,44 ; 8,89

6-ANADP (10^{-6}m): 0,889 ; 2,222 ; 4,44 ; 6,66 ; 8,89

b. 6-P-GDH (Rattenniere):

NADP (10^{-4}m): 0,976 ; 1,94

6-ANADP (10^{-6}m): 9,76 ; 7,32 ; 4,88 ; 2,43 ; 0,0976

c. 6-P-GDH (Hefe):

a. NADP: $0{,}93 \cdot 10^{-4}$m

6-ANADP (10^{-6}m): 9,3 ; 4,65 ; 0,93 ; 0,465 ; 0,093

b. NADP: $1{,}9 \cdot 10^{-4}$m

6-ANADP (10^{-6}m): 9,52 ; 4,76 ; 0,95 ; 0,476 ; 0,095

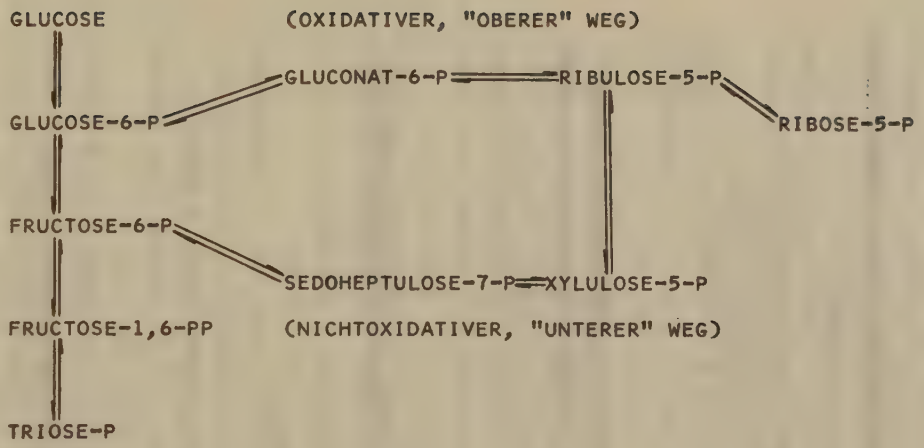

ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PENTOSE-PHOSPHAT-WEGES (NACH HORECKER)

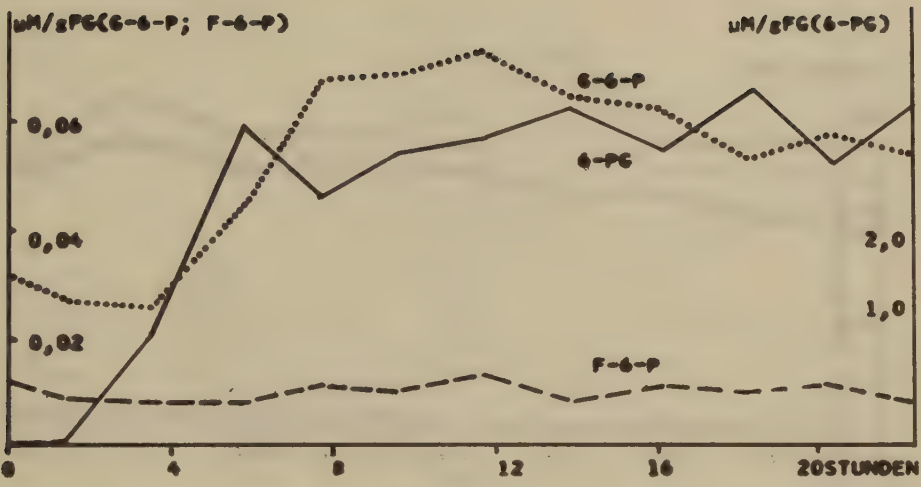

ABBILDUNG 3: KONZENTRATION VON G-6-P, F-6-P UND 6-PG
IN RATTENNIEREN NACH 35mg 6-AN/kg KG

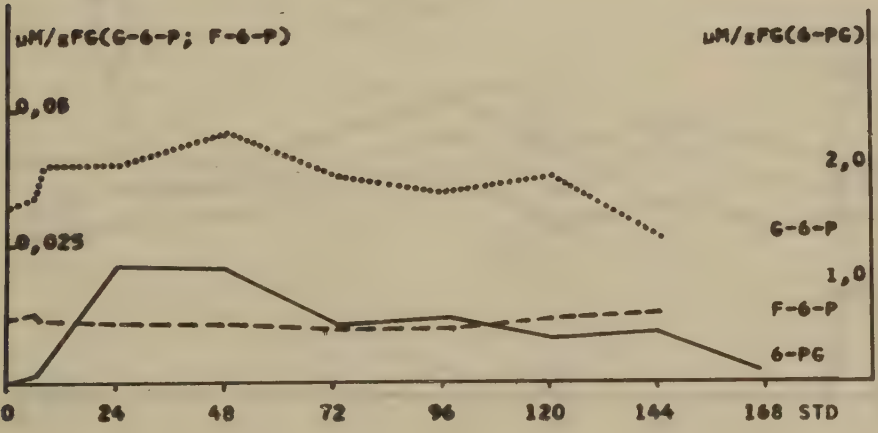

ABBILDUNG 4: KONZENTRATION VON G-6-P, F-6-P UND 6-PG
IN RATTENNIEREN NACH 6mg 6-AN/kg KG

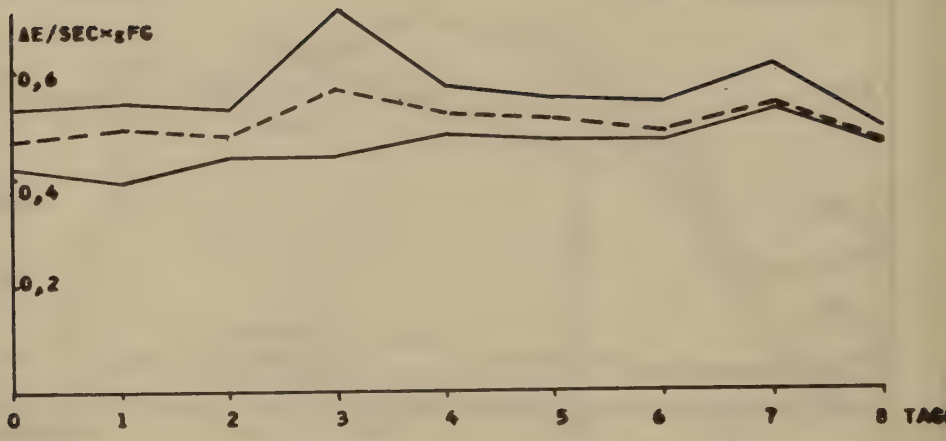

ABBILDUNG 5: ENZYMAKTIVITÄT DER 6-P-PDH IN RATTENNIEREN NACH 6mg 6-AN/kg

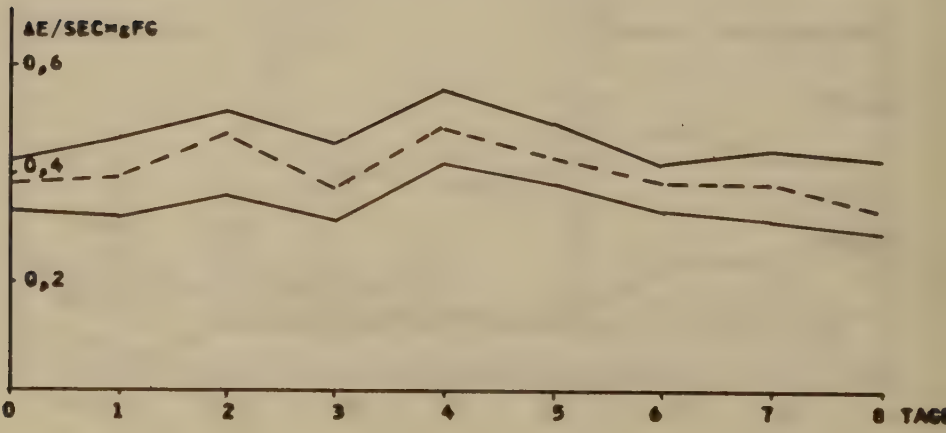

ABBILDUNG 6: ENZYMAKTIVITÄT DER 6-P-GDH IN RATTENNIEREN NACH 6mg 6-AN/kgKG

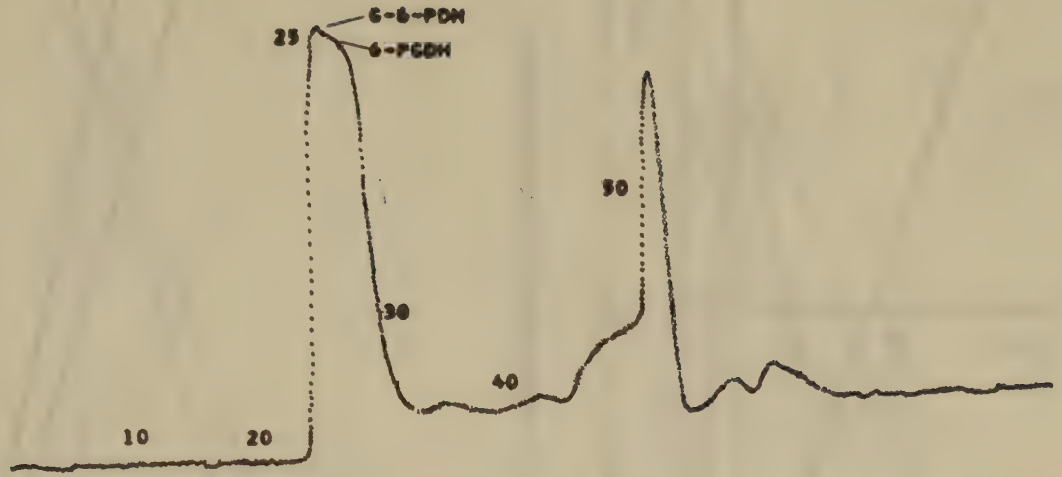

ABBILDUNG 7: ELUTIONSDIAGRAMM VON NIERENHYALOPLASMA (BESCHREIBUNG IM TEXT S. 10)

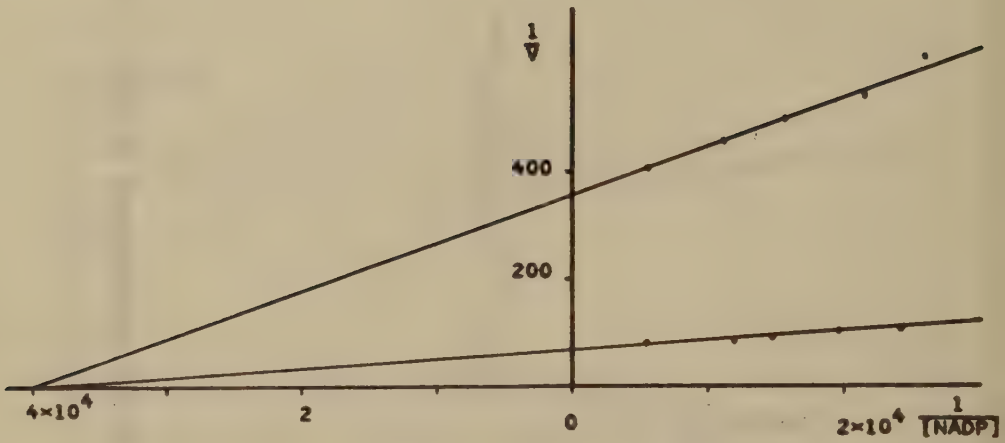

ABBILDUNG 8: K_M-WERT HEFE, 6-PHOSPHORGLUCONATDEHYDROGENASE

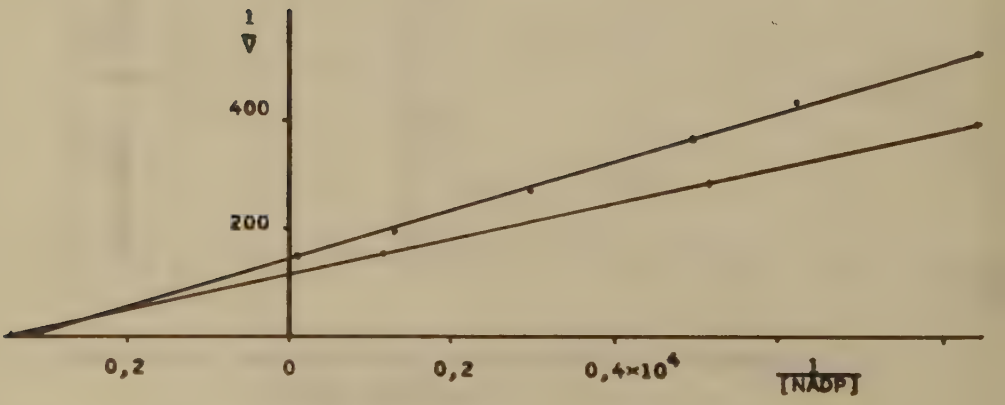

ABBILDUNG 9: K_M-WERT HEFE, GLUCOSE-6-PHOSPHATDEHYDROGENASE

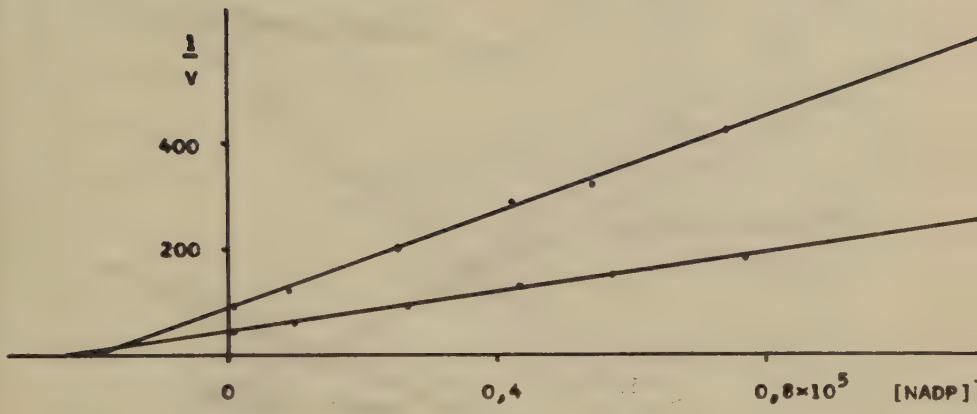

ABBILDUNG 10: K_M-WERT NIERE 6-PHOSPHOGLUCONATDEHYDROGENASE

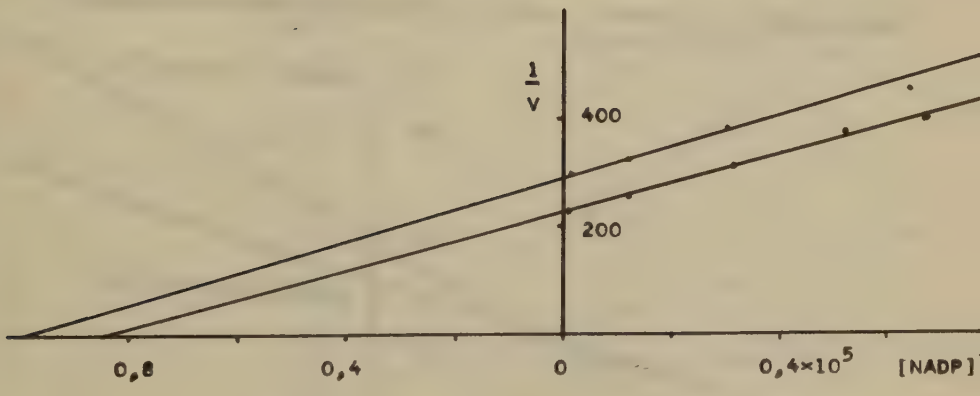

ABBILDUNG 11: K_M-WERT NIERE GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE

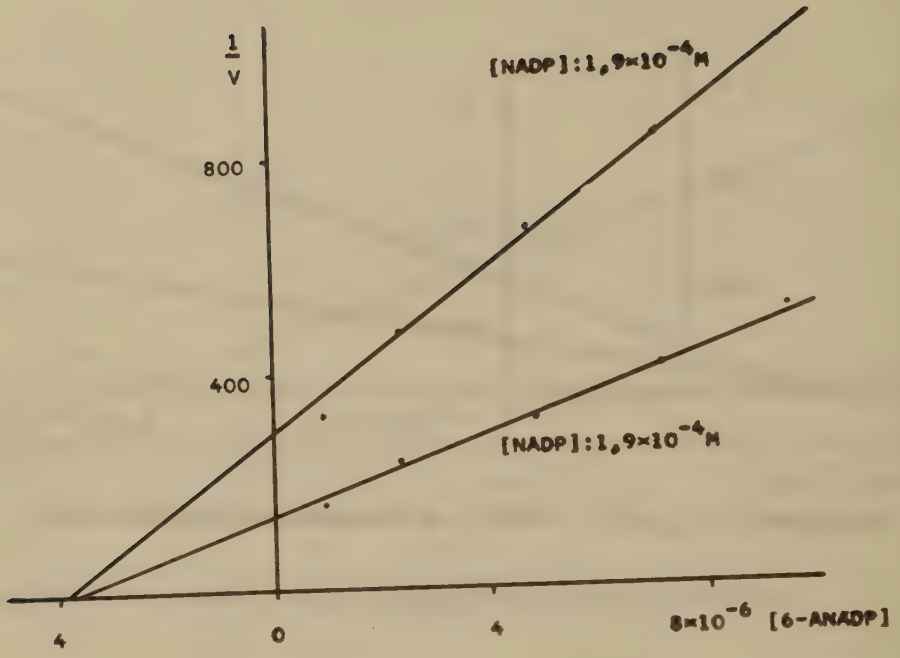

ABBILDUNG 12: K_1-WERT HEFE 6-PHOSPHOGLUCONATDEHYDROGENASE

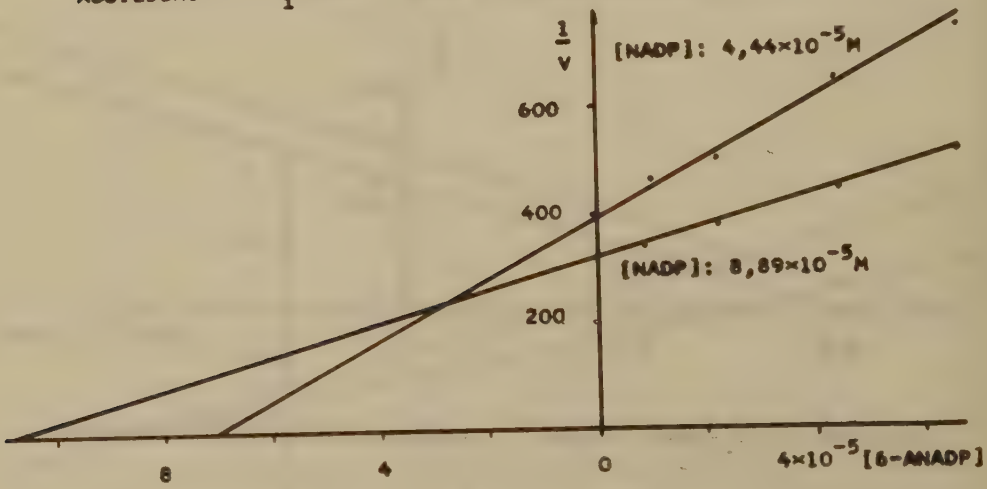

ABBILDUNG 13: K_1-WERT HEFE GLUCOSE-6-PHOSPHATDEHYDROGENASE

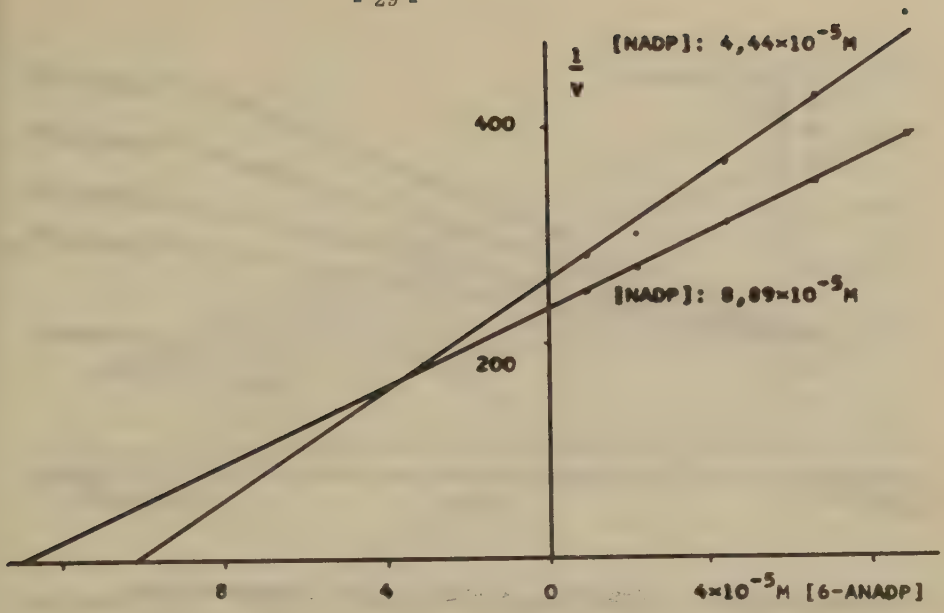

ABBILDUNG 14: K_i-WERT NIERE GLUCOSE-6-PHOSPHATDEHYDROGENASE

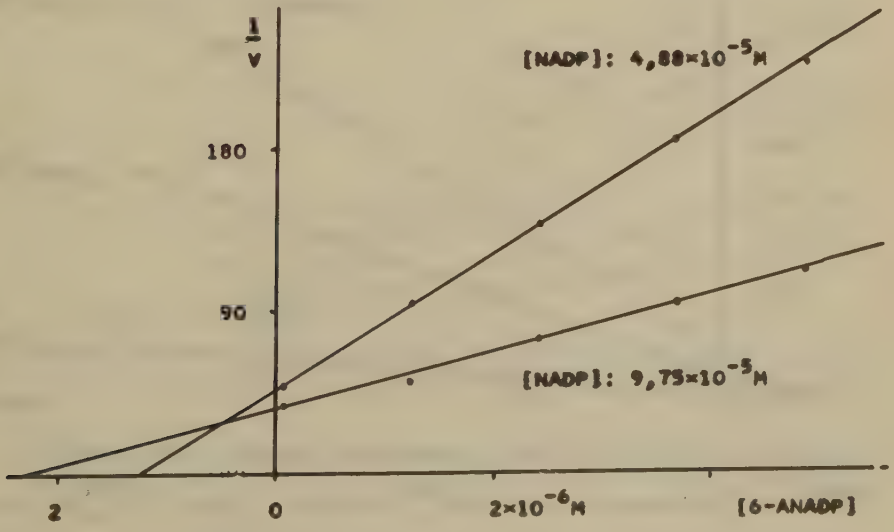

ABBILDUNG 15: K_i-WERT NIERE 6-PHOSPHOGLUCONATDEHYDROGENASE

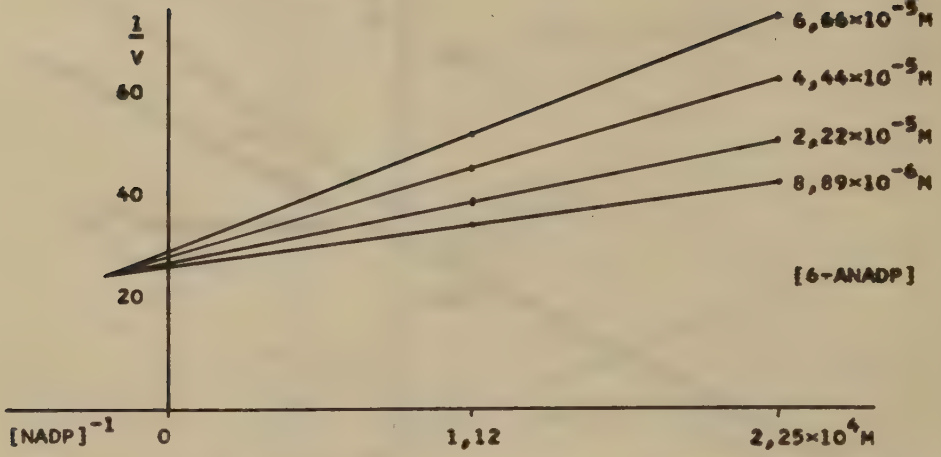

ABBILDUNG 16: HEFE G-6-PDH K_1-WERT NACH LINEWEAVER-BURK

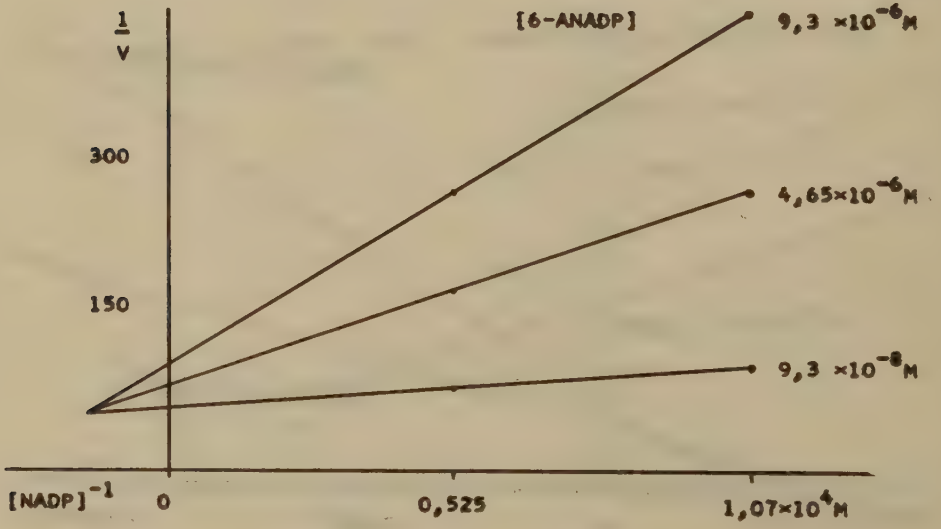

ABBILDUNG 17: HEFE 6-PGDH K_1-WERT NACH LINEWEAVER-BURK

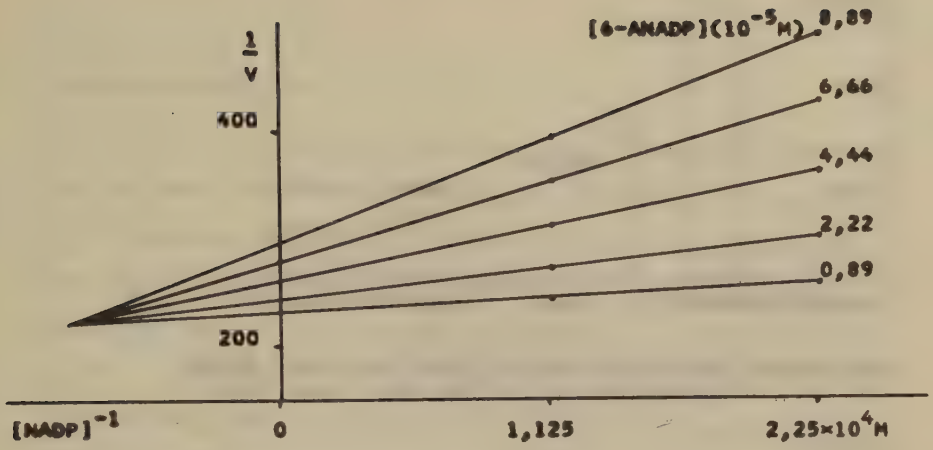

ABBILDUNG 18: NIERE G-6-PDH (K_i-WERT NACH LINEWEAVER-BURK)

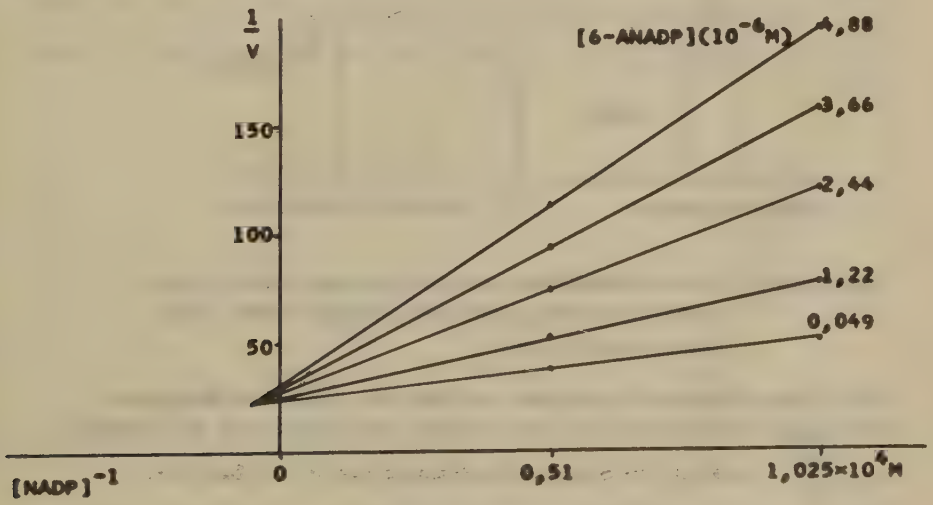

ABBILDUNG 19: NIERE 6-PGDH (K_i-WERT NACH LINEWEAVER-BURK)

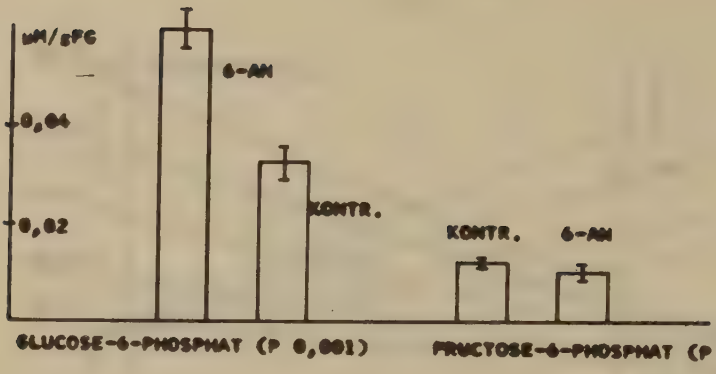

ABBILDUNG 20: KONZENTRATIONEN VON G-6-P UND F-6-P IN DER RATTENNIERE 9 STD. NACH 35mg 6-AN/kg KG

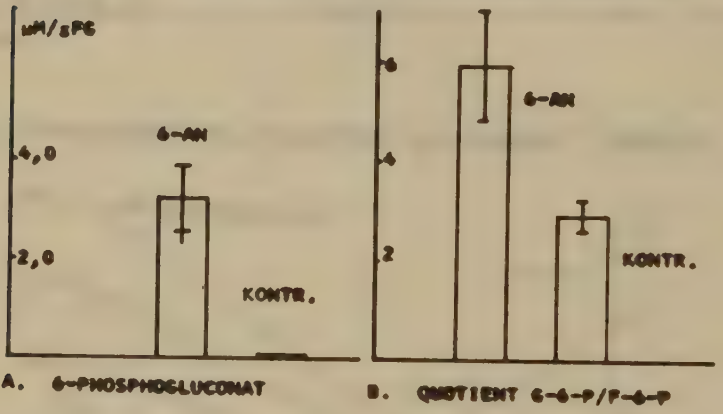

ABBILDUNG 21: 6-P-G-KONZENTRATION UND QUOTIENT G-6-P/F-6-P-KONZENTRATION IN DER RATTENNIERE 9 STD. NACH 35 mg 6-AN/kg KG

Die eingezeichneten Streuwerte stellen die doppelten mittleren Fehler des Mittelwerts dar. Sie wurden errechnet nach der Formel: $s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{s^2}{N}}$, wobei s die Standardabweichung und N die Zahl der Meßwerte ist. Die Signifikanzwerte, p, wurden aus einer Tabelle entnommen. Dazu mußten Testgröße (t) und Freiheitsgrade (FG) ermittelt werden nach den Formeln:

$$t = \frac{|\bar{x}_B - \bar{x}_A|}{s} \sqrt{\frac{N_A \cdot N_B}{N_A + N_B}}$$

und $FG = N_A + N_B - 2$, wobei x für Mittelwert, A für Versuchsgruppe und B für Kontrollgruppe steht.

L E B E N S L A U F

Ich bin am 6.8.42 in Zeitz geboren. Meine Kindheit verbrachte ich in Predel (Krs. Zeitz), wo ich die Grundschule von 1948-1956 besuchte. 1956 in die Zeitzer Mittelschule aufgenommen, kam ich 1957 nach Westberlin, wo ich die Robert-Blum-Schule besuchte, um dort 1961 das Abitur abzulegen. Von 1962-68 studierte ich an der FU Berlin Humanmedizin und bestand 1963 das Vorphysikum, 1964 das Physikum und 1968 das Staatsexamen. Die Medizinalassistentenzeit leistete ich vom 9.3.-30.11.69 am Pharmakologischen Institut der FU, vom 1.12.69-31.3.70 auf der Inneren Abteilung des Wenckebach-Krankenhauses und vom 1.4.-31.7.70 an der Chirurgischen Universitätsklinik Westend ab. Zum 3.8.1970 erhielt ich meine Bestallung als Arzt.